

10/531971
Rec'd PCT/PTO 20 APR 2005
PCI/KR 03/02704 #2
RO/KR 17.12.2003



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0078694
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 12월 11일
Date of Application DEC 11, 2002

출원인 : 씨제이 주식회사
Applicant(s) CJ Corp.

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



2003 년 12 월 09 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0002
【제출일자】	2002.12.11
【발명의 명칭】	5'-크산틸산을 생산하는 미생물
【발명의 영문명칭】	Microorganism producing 5'-Xanthylic acid
【출원인】	
【명칭】	씨제이 주식회사
【출원인코드】	1-1998-003466-9
【대리인】	
【성명】	이덕록
【대리인코드】	9-1998-000461-7
【포괄위임등록번호】	1999-001584-7
【발명자】	
【성명의 국문표기】	곽영현
【성명의 영문표기】	KWAG, Young Hyeon
【주민등록번호】	760223-1665914
【우편번호】	467-812
【주소】	경기도 이천시 마장면 덕평리 산34 남자기숙사 205호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	오기훈
【성명의 영문표기】	OH, Ki-Hoon
【주민등록번호】	741025-1037222
【우편번호】	467-812
【주소】	경기도 이천시 마장면 덕평1~2리
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김정환
【성명의 영문표기】	KIM, Jeong Hwan
【주민등록번호】	621227-1122748

【우편번호】 138-743
【주소】 서울특별시 송파구 가락2동 극동아파트 2-303
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 오윤석
【성명의 영문표기】 OH, Yoon Suk
【주민등록번호】 591122-1017418
【우편번호】 449-846
【주소】 경기도 용인시 수지읍 풍덕천리 703 통보아파트 101동 1501호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 심재익
【성명의 영문표기】 SIM, Jae Ick
【주민등록번호】 591224-1683612
【우편번호】 467-110
【주소】 경기도 이천시 증포동 선경2차아파트 205동 1604호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 박영훈
【성명의 영문표기】 PARK, Young Hoon
【주민등록번호】 511229-1010425
【우편번호】 463-703
【주소】 경기도 성남시 분당구 구미동 무지개대림아파트 111동 102호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 장재영
【성명의 영문표기】 CHANG, Jea Young
【주민등록번호】 701008-1228511
【우편번호】 431-080
【주소】 경기도 안양시 동안구 호계동 766-4 삼익아파트 101동 1701호
【국적】 KR
【심사청구】 청구

【미생물기탁】

【미생물기탁】

【기탁기관명】

【수탁번호】

【수탁일자】

【취지】

한국미생물보존센터

KCCM-10448

2002. 11. 21

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이덕록 (인)

【수수료】

【기본출원료】

10 면 29,000 원

【가산출원료】

0 면 0 원

【우선권주장료】

0 건 0 원

【심사청구료】

3 항 205,000 원

【합계】

234,000 원

【요약서】

【요약】

본 발명은 5' -크산틸산을 생산하는 코리네박테리움 암모니아게네스 (*Corynebacterium ammoniagenes*) KCCM 10340을 친주로 자외선 조사, N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘(NTG) 등의 변이 유발제로 통상적인 방법에 따라 처리하여 친주의 형질을 변형시켜 호흡 활성을 강화하기 위한 목적으로 배양과정에서 첨가된 고농도의 포도당 및 여러 탄소원에 의하거나 배양 후반에서의 5' -크산틸산이 배양액 내에 축적이 되면 균체 외부의 삼투압이 증가하여 5' -크산틸산 생산세포의 정상적인 생리활성이 저해되어 균체 생성이 둔화되고 5' -크산틸산 생성이 저하되는 것을 방지할 수 있는 삼투압 내성 형질이 부여된 균주 KCCM 10340 으로부터 ATP 합성 효소의 활성을 저해하며 산화적 인산화 과정의 저해제인 올리고마이신(oligomycin)에 대한 내성주를 선별하여 ATP 재생 활성을 강화하여 동일한 발효 시간 내에 5' -크산틸산을 고수율, 고농도로 배양액 중에 직접 축적시키는 미생물에 관한 발명이다.

【색인어】

5' -크산틸산, 코리네박테리움 암모니아게네스, N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘, 올리고마이신

【명세서】

【발명의 명칭】

5' -크산틸산을 생산하는 미생물 (Microorganism producing 5' -Xanthylic acid)

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- ◁ 본 발명은 5' -크산틸산을 생산하는 미생물 자체에 관한 것으로 좀더 구체적으로는 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*) KCCM 10340의 변이주로서 호흡 활성을 강화하기 위한 목적으로 ATP 합성 효소의 활성을 저해하며 산화적 인산화 과정의 저해제인 올리고마이신(oligomycin)에 대한 내성주를 선별하여 ATP 재생 활성을 강화하여 동일한 발효 시간 내에 5' -크산틸산을 고수율 및 고농도로 배양액 중에 직접 축적시키는 미생물에 관한 발명이다.
- ◁ 5'-크산틸산은 핵산 생합성 대사계의 중간 물질로 동식물의 체내에서 생리적으로 중요한 의미를 가질 뿐만 아니라 식품, 의약품 및 각종 의료분야 등 다방면에 이용되고 있으며, 본 발명은 당사가 개발한 공지의 균주 (KCCM 10340)로부터 올리고마이신 내성주를 선별하여 공지의 기술보다 직접발효법으로 고농도, 고수율의 5'-크산틸산을 생산하는 균주를 개발하여 본 발명을 완성하였다.
- ◁ 5' -크산틸산은 퓨린뉴클레오타이드(Purine nucleotide) 생합성 대사계의 중간 생성물로 5' -구아닐산(GMP)의 제조원료로서 중요한 물질이다. 정미성이 강하고 상품적 가치가 높은 5' -구아닐산의 제조방법으로서 현재 널리 이용되고 있는 방법은 미생물 발효법으로서, 5' -크산틸산

을 생산하고 이를 효소학적으로 5' -구아닐산으로 전환시키는 과정이 가장 경제적이어서 5' -구아닐산의 수요만큼 5' -크산틸산도 필요하다. 종래 5' -크산틸산의 제조방법에는 화학합성법, 또는 효모중의 리보핵산을 분해하여 제조된 5' -구아닐산을 탈아미노화하는 제조법, 그리고 발효법으로는 발효배지내 전구물질로 크산틴(Xanthine)을 첨가하는 방법과 미생물 변이주에 의한 제조법, 항생물질 첨가에 의한 제조법(일본특허 소42-1477, 소 44-20390) 및 계면활성제 첨가에 의한 제조법(일본특허 소42-3825, 소42-3838) 등이 알려져 있다. 이 중에서도 미생물 변이주에 의한 5' -크산틸산의 직접적인 발효 제조 방법이 공업적으로 유리하므로 본 발명자들은 기존의 코리네박테리움 암모니아게네스(KCCM 10340)가 소유하고 있는 형질을 개량하여 5'-크산틸산이 최대로 생산될 수 있는 형질을 부여함으로써 5'-크산틸산의 생산성이 월등히 증가한 변이주를 개발하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<4> 대부분의 미생물들은 충분한 영양 성분들의 공급이 이루어지는 경우 일정한 통기 조건하에서 배양을 지속하면 균체량이 더 이상 증가하지 못하는 상태에 이르며 특히 성장 의존적 산물인 일차 대사산물을 생산하는 미생물의 경우는 더 이상 산물의 농도가 증가하지 못하는 상태에 이른다. 이는 대개 용존 산소 공급량의 제

한에 따른 현상이다. 용존 산소 공급량의 제한을 해제하기 위하여는 폭기 조건 및 교반 조건 등을 강화하는 방법이 있으나 이는 실제 생산법에 있어서는 기술적이며 경제적인 한계에 부딪힌다. 이러한 한계를 극복하여 제한된 용존 산소 공급량의 한도내에서 균체량 및 미생물의 제반 생리 활성을 증가시켜 5'-크산틸산의 수율 및 농도를 증가시키기 위한 한 방법으로서 미생물의 호흡 활성을 증가시켜 동일 용존 산소 조건에서 ATP 재생 활성을 증가시키면 가능할 것으로 본 발명자들은 판단하였다. 따라서 본 발명자들은 다양한 호흡 억제제들에 대한 내성주들을 시험하여 본 결과 그 가운데 특히 올리고마이신 내성을 부여한 변이주가 크게 효과가 있었으며 직접 발효법에 의해 5'-크산틸산을 기존에 비해서 고농도, 고수율로 생산할 수 있음을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

【발명의 구성 및 작용】

본 발명은 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*)의 변이주로서 5' - 크산틸산을 생산하는 미생물 CJXOL 0201 (KCCM-10447)에 관한 것이다. 본 발명의 미생물 CJXOL 0201은 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*) KCCM 10340를 친주로 하여 자외선조사, N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘(NTG) 등의 변이 유발제로 통상적인 방법에 따라 처리한 후 올리고마이신이 농도별로 첨가된 (주 3)배지에서 생육할 수 있는 변이주들 중에서 선별된 것이다. 이때 실험에 사용된 배지중의 올리고마이신 농도는 50mg/l까지 사용하였으며, 올리고마이신 농도 20mg/l까지 내성이 있으며 20mg/l이상에서는 전혀 성장이 일어나지 않았으며, 본 발명자는 올리고마이신 농도 20mg/l에서도 생육하는 5' - 크산틸산 농도가 향상된 균주를 선별하여, 이 균주를 CJXOL 0201(KCCM-10447)라 명명하여 한국중균협회에 기탁하였다.

◁ (주1) 영양배지: 포도당 20g/l, 펩톤 10g/l, 효모엑기스 10g/l, 염화나트륨 2.5g/l, 우레아 3g/l, 아데닌 150mg/l, 구아닌 150mg/l, pH 7.2

◁ (주2) 최소배지: 포도당 20g/l, 인산제1칼륨 1g/l, 인산제2칼륨 1g/l, 우레아 2g/l, 황산암모늄 3g/l, 황산마그네슘 1g/l, 염화칼슘 100mg/l, 황산철 20mg/l, 황산망간 10mg/l, 황산아연 10mg/l, 비오틴 30ug/l, 티아민산염 0.1mg/l, 황산구리 0.8mg/l, 아데닌 20mg/l, 구아닌 20mg/l, pH 7.2

◁ (주3) 올리고마이신 첨가배지: (주2) 최소배지에 올리고마이신 1, 2, 5, 10, 20, 50 mg/l 첨가한 배지

◁ 본 발명에서 분리한 신규의 변이주 CJXOL 0201의 생화학적 특성은 표1의 기재와 같으며 이들 내용에 의하면 본 발명의 미생물은 10mg/l 농도의 올리고마이신 첨가배지에서도 생육 가능한 균주임을 알 수 있다. 본 발명 미생물의 특성은 다음의 표에 기재된 바와 같다.

<10> 【표 1】

올리고마이신 대한 내성 비교

올리고마이신 (mg/l)	0	1	2	5	10	20	50
KCCM 10340	+++	++	+	-	-	-	-
CJXOL 0201	+++	+++	++	++	+	-	-

<11> (주) + : 생육, - : 생육치 못함 30℃에서 5일 배양

<12> 실시예 1

<13> 사용 균주 ; 본 발명의 미생물 CJXOL 0201 및 KCCM 10340

<14> 종배지 : 포도당 30g/l, 펩톤 15g/l, 효모엑기스 15g/l, 염화나트륨 2.5g/l, 우레아 3g/l, 아데닌 150mg/l, 구아닌 150mg/l, pH 7.2

<15> 발효배지 : ①본배지 : 포도당 60g/l, 황산마그네슘 10g/l, 황산철 20mg/l, 황산아연 10mg/l, 황산망간 10mg/l, 아데닌 30mg/l, 구아닌 30mg/l, 비오틴 100ug/l, 황산구리 1mg/l, 티아민염산염 5mg/l, 염화칼슘 10mg/l, pH 7.2

<16> ②별살배지 : 인산제1칼륨 10g/l, 인산제2칼륨 10g/l, 우레아 7g/l, 황산암모늄 5g/l,

<17> 발효방법 : 상기 종배지 5ml을 지름 18mm 시험관에 분주하고 상법에 따라 가압 살균한 후 사용 균주를 접종하고 180rpm으로 30℃에서 18시간 진탕 배양하여 종배양액으로 사용하였다. 발효 배지 중 본배지와 별살배지를 각각 상법에 따라 가압 살균하여 미리 가압 살균한 500ml 용량의 진탕용 삼각 플라스크에 29ml과 10ml 씩 분주하고 종배양액 1ml을 식균한 다음 90시간 배양하였다. 회전수는 200rpm, 온도 30℃로 조절하였다. 배양 완료 후 5' -크산틸산의 배지내 축적량은 기존 균주 KCCM 10340가 23.0g/l이며, 본 발명 변이주 CJXOL 0201 균주는 26.5g/l 이었다. (5' -크산틸산의 축적 농도는 5' -크산틸산 나트륨·7H2O로 표시하였다.)

<18> 실시예2

<19> 사용균주 : 실시예1과 동일함

- <20> 1차 종배지 : 실시예 1의 1차 종배지와 동일함
- <21> 2차 종배지 : 포도당 60g/l, 인산제1칼륨 2g/l, 인산제2칼륨 2g/l, 황산마그네슘 1g/l, 황산철 22mg/l, 황산아연 15mg/l, 황산망간 10mg/l, 황산구리 1mg/l, 염화칼슘 100mg/l, 비오틴 150ug/l, 아데닌 150mg/l, 구아닌 150mg/l, 티아민산염 5mg/l, 소포제 0.6ml/l, pH 7.2
- <22> 발효배지 : 포도당 151g/l, 인산 32g/l, 수산화칼륨 25g/l, 아데닌 198mg/l, 구아닌 119mg/l, 황산철 60mg/l, 황산아연 42mg/l, 황산망간 15mg/l, 황산구리 2.4mg/l, 알라닌염 22mg/l, NCA 7.5mg/l, 비오틴 0.4mg/l, 황산마그네슘 15g/l, 시스틴염 30mg/l, 히스티딘염 30mg/l, 염화칼슘 149mg/l, 티아민염 15mg/l, 소포제 0.7ml/l, CSL 27ml/l, 참치엑기스 6g/l, pH 7.3
- <23> 1차 종배양 : 상기 1차 종배양 배지 50ml을 500ml 진탕용 삼각 플라스크에 분주하고 121℃에서 20분간 가압 살균하여 냉각한 후 사용 균주를 접종하고 30℃에서 180rpm으로 24시간 진탕 배양하였다.
- <24> 2차 종배양 : 2차 종배지를 5리터 용량의 실험용 발효조에 2리터씩 분주하고 121℃에서 10분간 가압 살균한 후 냉각하여 1차 종배양액의 배양완료액 50ml을 접종한 후 공기를 0.5vvm으로 공급하면서 900rpm, 31℃에서 24시간 배양하였다. 배양 중 pH는 암모니아수로 7.3로 조절하였다.
- <25> 발효방법 : 상기 발효배지를 30리터 용량의 실험용 발효조에 8리터씩 분주하고 121℃에서 20분간 가압 살균한 뒤 냉각하여 2차 종배양액을 1.5리터씩 접종한 후 공기를 1vvm으로 공급하면서 400rpm, 33℃에서 배양하되 배양중 잔존 당농도가 1% 이하가 되면 살균된 포도당을 공급하여

발효배지에 첨가된 총당의 함계가 30%로 조절하였다. 배양 중 pH는 암모니아수로 7.3로 조절하여 90시간 배양하였다. 배양완료 후 5' -크산틸산의 배지내 축적량은 종래균주 KCCM 10340 는 137.2g/l이고 본 발명의 변이주 CJXOL 0201는 148.4g/l 이었다. (5' -크산틸산의 축적농도는 5' -크산틸산 나트륨·7H₂O로 표시하였다.)

【발명의 효과】

- 6> 본 발명은 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*) KCCM 10340을 친주로 자외선 조사, N-메틸-N'-니트로-N'-니트로소구아니딘(NTG) 등의 변이 유발제로 통상적인 방법에 따라 처리하여 친주의 형질을 변형시켜 더욱더 삼투압내성을 강화하기 위한 목적으로 배양과정에서 첨가된 고농도의 포도당 및 여러 탄소원에 의하거나 배양 후반에서의 5' -크산틸산이 배양액 내에 축적이 되면 균체 외부의 삼투압이 증가하여 5' -크산틸산 생산 세포의 정상적인 생리활성이 저해되어 균체 생성이 둔화되고 5' -크산틸산 생성이 저하되는 것을 방지할 수 있는 삼투압 내성 형질이 부여된 균주 KCCM 10340로부터 호흡 활성을 강화하기 위한 목적으로 ATP 합성 효소의 활성을 저해하며 산화적 인산화 과정의 저해제인 올리고마이신(oligomycin)에 대한 내성주를 선별하여 ATP 재생 활성을 강화하여 동일한 발효 시간 내에 5' -크산틸산을 고수율, 고농도로 배양액 중에 직접 축적시키는 효과를 이루었다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

울리고마이신에 대해 내성을 가지며, 5'-크산틸산을 생산하는 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*)

【청구항 2】

제1항에 있어서, 코리네박테리움 암모니아게네스는 CJXOL 0201 (KCCM-10447)인 것을 특징으로 하는 코리네박테리움 암모니아게네스.

【청구항 3】

제 1항 또는 2항에 있어서의 코리네박테리움 암모니아게네스를 이용하여 5'-크산틸산을 생산하는 방법.